动 物 学 研 究 2005, Apr. 26 (2): 197-202 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

牛血清白蛋白对小鼠原核期胚胎玻璃化冷冻的影响

关 沫[1,2], 杨世华[1], 司 维[1,2], 采克俊[1], 季维智[1,*]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 以小鼠原核期胚胎为对象, 以胚胎的存活率、卵裂率、囊胚率以及囊胚细胞数作为检测指标, 在M2液的基础上添加8种浓度 (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 96 mg/mL) 牛血清白蛋白 (BSA) 配置防冻液, 探讨防冻液和玻璃化冷冻后对胚胎发育的影响。BSA防冻液对胚胎发育影响的实验结果表明, 8个浓度组间以及与对照组间胚胎的卵裂率、囊胚率以及囊胚细胞数无显著差异 ($P>0.05$), 说明在防冻液中加入一定浓度的BSA对小鼠胚胎无毒性作用。防冻液经玻璃化冷冻后对胚胎发育影响的实验表明, 8个浓度组间冷冻胚胎复苏后的存活率、卵裂率、囊胚率及囊胚细胞数无显著差异 ($P>0.05$)。表明BSA在这种防冻液中没有明显的保护作用。从经济、实用、生物安全角度考虑, 不支持在玻璃化防冻液中添加BSA。

关键词: 牛血清白蛋白; 玻璃化冷冻; 原核期胚胎; 小鼠
中图分类号: S865.13; Q492 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853 (2005) 02-0197-06

Effect of Bovine Serum Albumin on Vitrification of Pronuclear-Stage Mouse Embryo

GUAN Mo[1,2], YANG Shi-hua[1], SI Wei[1,2], CAI Ke-jun[1], JI Wei-zhi[1,*]
(1. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650223, China;
2. Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The cryoprotective effect and toxicity of Bovine Serum Albumin (BSA) at 8 concentrations (0, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 96 mg/mL, respectively) supplemented in cryoprotectant solutions on mouse pronuclear-stage embryo vitrification were studied. Survival rate, cleavage rate, blastocyst rate and mean cell numbers of blastocyst of vitrified embryos were used as criterion to evaluate the effect of BSA on the post-thawed embryos development. The results showed that no statistical differences of survival rate, cleavage rate, blastocyst rate and mean cell numbers of blastocyst of vitrified groups both in the toxic effect assay ($P>0.05$) and the vitrification assay ($P>0.05$). The results indicated that BSA in this cryoprotectant solutions has no effect on the viability of pronuclear-stage embryos. Economical, practical and biosecure considerations do not support the use of BSA in vitrificationsolutions.

Key words: BSA; Vitrification; Pronuclear-stage embryos; Mouse

自从1972年小鼠胚胎超低温冷冻成功并产生后代 (Whittingham et al, 1972) 以来, 哺乳动物胚胎低温保存的基础和应用研究已经取得了长足的发展, 先后有十几种哺乳动物胚胎的低温保存取得成功 (Rall, 1992)。早期哺乳动物胚胎低温保存主要使用慢速降温—慢速复苏的方法。直到1985年, Rall & Fahy首次使用一种无冰晶的超快速的冷冻方法——玻璃化冷冻法, 成功冷冻了小鼠胚胎。从此, 玻璃化冷冻法逐渐成为最主要的低温保存技术之一。近10来年, 玻璃化冷冻法在家畜胚胎冷冻方面也取得了较好的效果 (Massip et al, 1986; Yaswiati & Holtz, 1990; Kasai et al, 1992; Begin et al, 2003)。玻璃化冷冻法与传统的慢速冷冻法相比, 主要有两点优势: 首先, 玻璃化冷冻法在降

收稿日期: 2004-11-26; 接受日期: 2005-01-11
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370166); 国家重点基础研究发展规划项目 (G2000016108); 中国科学院知识创新工程资助项目 (KSCX1-05)
* 通讯作者 (Corresponding author), Tel: +86-871-5139413, Fax: +86-871-5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

温、储藏和复苏过程中避免了细胞内外冰晶的形成，缩短了胚胎在某一敏感温度范围的平衡时间，减轻了在慢速冷冻过程中对细胞造成的冷冻损伤。其次，玻璃化冷冻法缩短了冷冻过程所需的时间，操作简便，不需要价格昂贵的程序降温仪，降低了实验成本（Sun & Hu，2003）。快速的降温速率和高浓度的防冻剂，是玻璃化冷冻法获得成功的必要条件，但玻璃化冷冻中高浓度的防冻液对胚胎会有潜在的生物和化学毒性（Bagis et al，2004）。玻璃化冷冻法研究的重点之一是寻找容易实现玻璃化且对胚胎损伤较小的低毒性防冻剂。在防冻液中添加大分子聚合物（PVP，Ficoll 和右旋糖苷）、糖类以及蛋白不仅能产生玻璃化作用且能降低渗透性防冻剂的使用浓度（渗透性防冻剂的浓度 > 30%），结果不影响防冻液的玻璃化特性，还可以降低对细胞的生物和化学毒性（Palasz & Mapletoft，1996），缓解高浓度的防冻剂液对胚胎造成的损伤（Shaw et al，1997）。

牛血清白蛋白（BSA）作为一种大分子物质，具有稳定细胞膜、抑制脂质过氧化（Alvarez & Storey，1993）、增溶和乳化等作用（De Leeuw et al，1993）。它可能通过阻止细胞膜磷脂的过氧化或溶解磷脂使膜具有一定的流动性，减少膜脂在冷冻过程中的损伤（Watson，1981）；也可能通过降低液体表面张力（Palasz et al，1995），增强膜的渗透性和缓解由渗透压变化而造成的损伤的作用（Webster，1982）。因而普遍被用在胚胎操作液、培养液和防冻液中（Braun et at，1995）。此外，加有 BSA 的防冻液具有表面活化的特性，这一特性在降温和复苏中有利于减少或降低冰晶的形成（Vicente et al，1999）。BSA 已在牛（De Leeuw et al，1993）和鲑鱼（Cabrita et al，2001）精子，小鼠（Shaw & Trounson，1989）、马（Braun et al，1995）、兔（Vicente et al，1999）胚胎的慢速冷冻中，作为种质细胞防冻液的组分之一。研究认为 4 mg/mL 的 BSA 有最好的保护作用（Harison，1987）。但在玻璃化冷冻过程中，玻璃化防冻液中渗透性防冻剂的浓度很高，胚胎常处于急剧膨胀和收缩、急剧升温和降温的过程中，细胞膜更需要很好的保护，但是 BSA 在胚胎玻璃化冷冻过程中是否有很好的保护作用，是否存在最适宜浓度还尚未见详细报道。本实验选用对低温保存敏感的原核期胚胎（Bernart et al，1994），研究不同浓度的 BSA 在玻璃化冷冻过程中对原核期小鼠胚胎的保护作用。

1 材料与方法

1.1 胚胎的来源和收集

实验用鼠为 6 ~ 8 周龄昆明白雌鼠和 10 ~ 12 周龄 C57BL/6 × DBA/2 的 F1 代雄鼠（由四川省医学科学院实验动物研究所提供）。饲养条件为人工控温 22 ~ 26 ℃，12L∶12D 光照，自由饮水取食。昆明白雌鼠先腹腔注射 10IU PMSG（天津市华孚高新生物技术公司生产），48 h 后腹腔注射 10IU hCG（丽珠集团丽宝生物生化制药有限公司生产）。随后与 C57BL/6 × DBA/2 的 F1 代雄鼠合笼，次日早上检查阴道栓。在注射 hCG 23 ~ 25 h 后，有阴道栓的雌鼠断颈处死，分离输卵管并除去粘附的血液和脂肪，然后置于 M2 + 4 mg/mL BSA 中，撕开膨大的输卵管壶腹部，使卵团流出，然后在含 300 IU/mL 透明质酸酶中处理，约 3 min 后，胚胎移入 M2 + 4 mg/mL BSA 中洗涤 3 次，在 Nikon-40 倒置显微镜下观察胚胎的形态，挑取形态完整和有两个原核的胚胎用于实验。

1.2 实验用液体的配置

所有防冻液的配方参照 Dinnyes et al（2000）。本实验中，使用的平衡防冻液、玻璃化防冻液以及复苏液都是在 M2 液的基础上配置。平衡防冻液是在 M2 液中加入 8%（v/v）乙二醇（Ethylene glycol，EG：E-9192，Sigma），并分别加入 0、2、4、8、16、32、64、96 mg/mL 的 BSA（A-9647，Sigma）配置而成。玻璃化防冻液是在 M2 液中加入 35%（v/v）EG、0.5 mol/L 蔗糖（S-1888，Sigma）以及相应浓度的 BSA。复苏液是在 M2 液中加入 0.4 mol/L 蔗糖及相应浓度的 BSA 配制而成。胚胎培养选用 mKSOM 培养液（Lawitts & Biggers，1993；Erbach & Papaioannou，1994）。

1.3 胚胎培养

复苏后的胚胎移入 mKSOM 培养液，于 37 ℃、5% CO_2、95%空气、饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养 96 h 至囊胚。

1.4 胚胎复苏后的检测

复苏后 4 h 检查胚胎的复苏率，以透明带完好无损、卵周隙清晰、胞内无碎片的胚胎记为存活胚胎（图 1A），存活胚胎数与冻存胚胎总数之比为存活率。在培养19 h后检查细胞的卵裂率，有正常两个

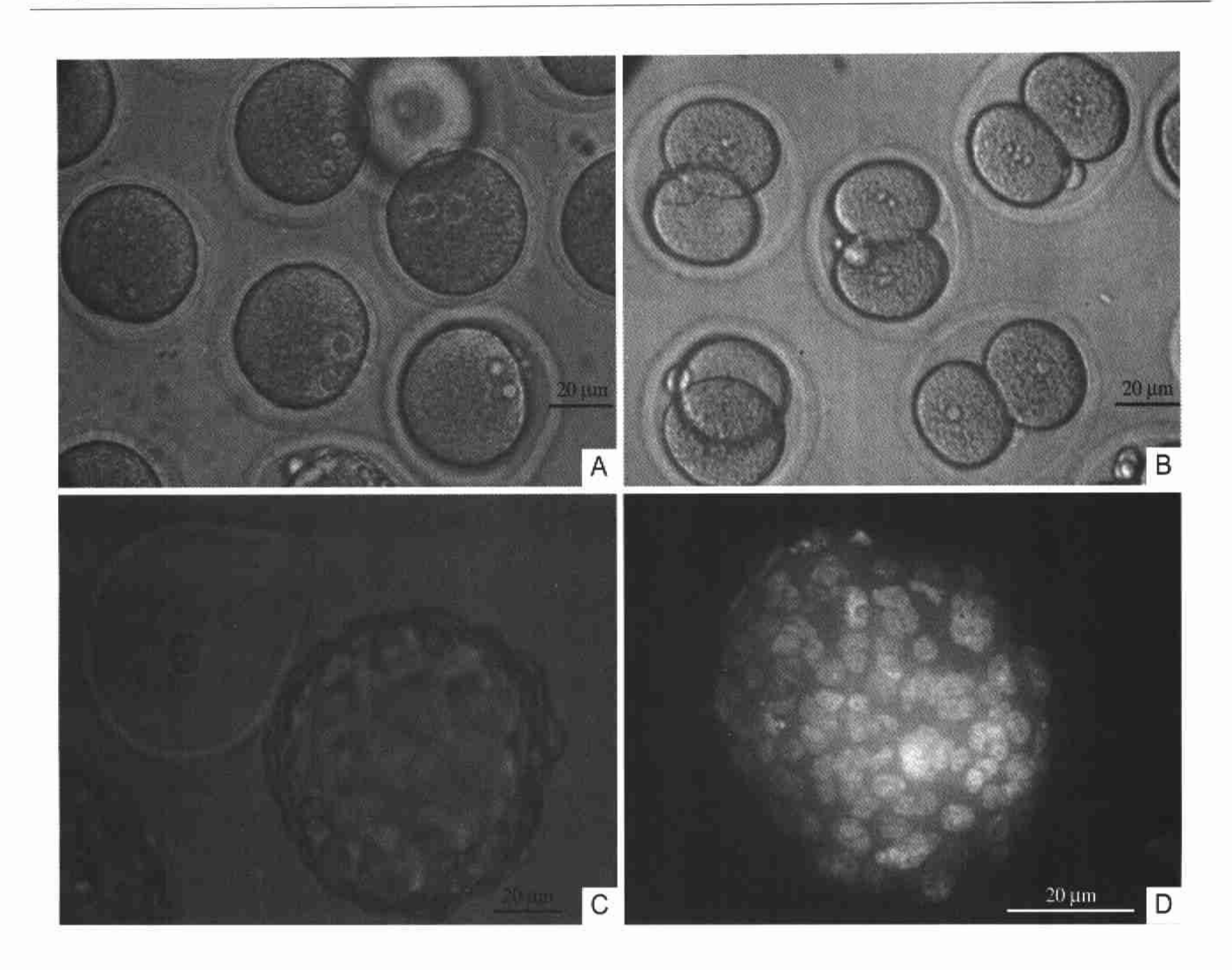


图 1　玻璃化冷冻复苏后小鼠原核期（A）、2－细胞期（B）、囊胚期胚胎（C）及 Hochest 33342 染色囊胚（D）

Fig. 1　Post-thawed embryos development at pronuclear stage (A), 2-cell stage (B), blastocyst stage (C) and blastocyst stained by Hochest 33342 (D)

分裂球的二细胞胚胎视为正常卵裂（图 1B），正常卵裂的胚胎数与存活胚胎数之比为卵裂率。培养 96 h 后，检查发育至囊胚（图 1C）的胚胎数，囊胚数与正常卵裂的胚胎数之比为囊胚率。获得的囊胚用 Hochest 33342（10 mg/mL）染色，在培养箱中温浴 15 min 后，压片，在荧光显微镜紫外光下计数，每一个囊胚中细胞核（图 1D）的数目记作囊胚细胞数。

1.5　实验设计

本实验共设 9 组：以 BSA 的浓度分为 8 组，即 0、2、4、8、16、32、64、96 mg/mL；对照组为新鲜的胚胎，不经任何处理，直接在 mKSOM 培养至囊胚。首先检测 BSA 防冻液对小鼠胚胎发育的影响，然后用此防冻液对小鼠胚胎进行玻璃化冷冻实验。

1.5.1　防冻液对胚胎发育的影响实验　把原核期的小鼠胚胎在室温（20～25 ℃）的平衡液中平衡 10 min 后，转入 50 μL 的玻璃化防冻液中；然后用 0.25 mL 的普通麦管（France），依次吸入 2 cm 的玻璃化防冻液→0.5 cm 的空气→2 cm 的有胚胎的玻璃化防冻液→0.5 cm 的空气→1 cm 的玻璃化防冻液，封口。

在玻璃化防冻液中停留 40 s，不经过降温步骤，直接将管中的防冻液转入 0.4 mol/L 蔗糖的复苏液中，平衡 3～5 min 后，将胚胎依次转入到 0.2、0.1 mol/L 的蔗糖复苏液和 M2 液中，各平衡 3～5 min，然后转入新鲜的 mKSOM 培养基中继续培养。实验重复 6 次。

1.5.2　小鼠胚胎的玻璃化冷冻实验　胚胎冷冻前的平衡和装管方法同前。装管后投入液氮。从胚胎转入玻璃化防冻液到装管投入液氮，此过程控制在 30～40 s 内。胚胎在液氮中保存 1 天后复苏。

复苏时，将麦管从液氮中取出，在空气中停留 5 s，放入 20～25 ℃的水浴中，5 s 后取出麦管，

剪掉麦管两端，将麦管中的防冻液转入0.4 mol/L蔗糖的复苏液中，平衡3~5 min后，将胚胎依次转入到0.2 mol/L、0.1 mol/L的蔗糖复苏液和M2液中各平衡3~5 min后，转入新鲜的mKSOM培养基中继续培养。实验重复8次。

1.6 统计分析

实验结果用平均值±标准差表示。百分率经过平方根的反正弦转换，采用单因素方差分析，用最小显著差数法（least significant difference test）比较两两数据间的差异显著性。

2 结 果

2.1 不同BSA浓度防冻液对胚胎复苏后存活率、分裂率和囊胚率的影响

8组BSA防冻液对胚胎发育影响的实验结果见表1。不同BSA浓度防冻液对胚胎复苏后存活率、分裂率和囊胚率无显著影响（ANOVA，$P>0.05$）。卵裂率：64 mg/mL组最低（94.9%），0 mg/mL组最高（99.1%）；囊胚率：8 mg/mL组最低（77.2%），对照组最高（88.8%）；囊胚的平均细胞数：8 mg/mL组最低（95.8），对照组最高（101.4），但各浓度组及对照组均无显著差异（$P>0.05$）。

2.2 不同BSA浓度防冻液在玻璃化冷冻中对胚胎复苏后的存活率、卵裂率和囊胚率的影响

8组防冻液玻璃化冷冻结果见表2。不同BSA浓度防冻液在玻璃化冷冻中对胚胎复苏后的存活率、卵裂率和囊胚率无显著影响（ANOVA，$P>0.05$）。存活率：96 mg/mL组最低（83.9%），64 mg/mL组最高（94.9%），但各组间无显著差异（$P>0.05$）。卵裂率：32 mg/mL组最低（93.4%），96 mg/mL组最高（98.4%），各组间无显著差异（$P>0.05$）。囊胚率：2 mg/mL组最低（40.7%），对照组最高（85.9%），各浓度组间无显著差异（$P>0.05$），但所有浓度组与对照组都有显著差异（$P<0.05$）。囊胚的平均细胞数：96 mg/mL组最低（92.0），2 mg/mL组最高（102.4），但各组间无显著差异（$P>0.05$）。

3 讨 论

本实验在EG防冻液的基础上加入不同浓度的BSA，首先检测不同浓度的BSA防冻液对小鼠原核期胚胎发育的影响。结果发现，即使BSA达到96 mg/mL浓度时也没有表现出对胚胎发育的影响。可见，BSA在一定浓度范围内对胚胎无毒性。

在不同物种、不同发育阶段胚胎的冷冻中，BSA的保护作用不同。在牛胚胎的慢速冷冻过程中，BSA在10%甘油的防冻液中对胚胎没有显示出保护作用，而在5%甘油中却有一定的保护作用（Palasz，2000）。同样，在小鼠2-细胞胚胎的超快速冷冻中，BSA在3.0 mol/L的二甲亚砜防冻液中也没有保护作用（Shaw & Trounson，1989）。本实

表1 8种浓度BSA防冻液对小鼠原核期胚胎发育的影响

Tab. 1 Effects of eight kinds of concentrations of BSA on further development of non-vitrified pronuclear-stage mouse embryos

实验组 Treatment	牛血清白蛋白的浓度 Concentration of BSA (mg/mL)	原核期胚胎数 No. of zygotes treated	卵裂数（率） No. of cleavage cell (%)	囊胚数（率） No. of blastocyst (%)	囊胚的平均细胞数 No. of cellsin blastocyst
1	0	154	152 (99.1±0.9)	122 (81.0±1.7)	99.5±9.3
2	2	152	150 (97.9±2.1)	118 (79.8±2.1)	95.1±6.1
3	4	154	150 (97.0±1.9)	120 (83.7±7.4)	96.9±5.5
4	8	128	124 (97.7±2.3)	94 (77.2±5.2)	95.8±13.4
5	16	156	150 (95.5±1.1)	114 (78.1±4.4)	96.2±5.9
6	32	138	132 (96.4±1.8)	108 (85.1±5.9)	97.6±8.0
7	64	132	126 (94.9±1.3)	106 (85.8±3.6)	96.3±7.5
8	96	116	114 (98.3±1.7)	96 (84.4±5.3)	94.9±8.3
对照组 Control	—	160	158 (97.9±2.1)	114 (88.8±4.5)	101.4±8.9

各组之间无显著差异（最小显著差数法，$P>0.05$）。

There were no significant difference among groups (least significant difference test, $P>0.05$).

表 2 8种 BSA 浓度的防冻液对小鼠原核期胚胎玻璃化冷冻的影响

Tab. 2 Effects of eight kinds of concentrations of BSA on survival and further development of vitrified/warmed pronuclear-stage mouse embryos

实验组 Treatment	牛血清白蛋白的浓度 Concentrations of BSA (mg/mL)	原核期胚胎数 No. of zygotes treated	复苏后存活数（率） No. of post-thaw intact (%)	卵裂数（率） No. of cleavage cell (%)	囊胚数（率） No. of blastocyst (%)	囊胚的平均细胞数 No. of cellsin blastocyst
1	0	264	244 (92.7±1.4)	238 (97.6±8.5)	112 (47.7±8.4)^{b}	93.4±9.6
2	2	242	254 (90.3±3.1)	250 (98.3±1.1)	108 (40.7±6.9)^{b}	102.4±3.5
3	4	270	248 (88.3±6.2)	234 (94.9±2.0)	116 (47.6±2.5)^{b}	94.0±3.5
4	8	282	258 (91.3±3.6)	250 (96.8±2.0)	134 (53.1±11.1)^{b}	89.8±11.5
5	16	284	254 (88.4±7.2)	244 (96.6±1.2)	114 (48.3±6.2)^{b}	96.2±14.3
6	32	292	270 (92.0±2.5)	254 (93.4±2.0)	130 (50.2±3.8)^{b}	92.4±1.6
7	64	276	264 (94.9±3.5)	254 (97.2±1.9)	138 (52.8±3.8)^{b}	94.5±3.9
8	96	262	218 (83.9±4.2)	214 (98.4±9.3)	100 (46.9±5.6)^{b}	92.0±9.1
对照组 Control	—	274	—	266 (97.0±1.0)	228 (85.9±2.2)^{a}	94.6±3.7

上标字母不同表示差异显著（最小显著差数法，$P<0.05$）。

Different superscripts indicate significant difference (least significant difference test, $P<0.05$).

验选用对冷冻更为敏感的小鼠原核期胚胎，采用了以35% EG防冻液为基础的玻璃化冷冻方法，在玻璃化冷冻过程中，无论是低浓度（0 mg/mL）还是高浓度（96 mg/mL）的BSA，其组成的防冻液对冷冻胚胎复苏后的存活率、分裂率、囊胚率及囊胚平均细胞数均无影响，说明BSA在玻璃化冷冻过程中未显示出协同保护作用，也未表现出降低EG毒性的作用。这可能与防冻液中EG浓度、冷冻条件以及防冻液的组成比例有关。

BSA是一种细胞表面活性剂，添加在防冻液中防止胚胎和麦管黏附而丢失（Shaw & Trounson, 1989）。但在实验操作过程中，即使低浓度的BSA组中，也未发现胚胎丢失的情况，这可能与EG本身也具有表面活性剂的特性有关。另外，在64 mg/mL BSA组和96 mg/mL BSA组中，由于BSA的浓度过高，操作过程中容易产生气泡而丢失胚胎，而且复苏过程中胚胎常悬浮于复苏液的不同层面，给拣胚带来很大不便，说明在操作液中不适合添加高浓度的BSA。

冷冻复苏后虽然各浓度组的胚胎存活率、分裂率与对照组无显著差异，但各浓度组的囊胚率与对照组相比明显降低，都有显著差异，而防冻液处理过的胚胎囊胚发育率与对照组没有明显差异，说明冷冻复苏过程对胚胎的后续发育能力有一定损伤，且是一种滞后损伤，将影响2-细胞后的发育能力。这种冷冻损伤机理有待进一步研究。

总之，本实验结果表明，BSA在以一定浓度EG为基础的玻璃化防冻液中，对小鼠胚胎无明显的毒副作用，也无明显的保护作用。从经济、实用、生物安全角度考虑，我们不支持在玻璃化防冻液中添加BSA。

参考文献：

Alvarez JG, Storey BT. 1993. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerol and other polyols as sole cryoprotectant [J]. *J. Androl.*, **14** (3): 199-209.

Bagis H, Sagirkaya H, Odaman MH, Dinnyes A. 2004. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: Comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution [J]. *Molecular Reproduction and Development*, **67** (2): 186-192.

Begin I, Bhatia B, Baldassarre H, Dinnyes A, Keefer CL. 2003. Cryopreservation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods [J]. *Theriogenology*, **59** (8): 1839-1850.

Bernart W, Kamel M, Neulen J, Breckwoldt M. 1994. Influence of the developmental stage and the equilibration time on the outcome of ultrarapid cryopreservation of mouse embryos [J]. *Hum. Reprod.*, **9** (1): 100-102.

Braun J, Hochi S, Oguri N, Sato K, Torres-Boggino F. 1995. Effect of different protein supplements on motility and plasma membrane integrity of frozen-thawed stallion spermatozoa [J]. *Cryobiology*, **32** (5): 487-492.

Cabrita E, Anel L, Herraez MP. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm [J]. *Theriogenology*, **56** (4): 623-635.

De Leeuw FE, De Leeuw AM, Den Daas JH, Colenbrander B, Verkleij AJ. 1993. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing [J]. *Cryobiology*, **30** (1): 32-44.

Dinnyes A, Dai YP, Jiang S, Yang XZ. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer [J]. *Biol. Reprod.*, **63** (2): 513-518.

Erbach GT, Papaioannou VE. 1994. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media [J]. *Biol. Reprod.*, **50** (5): 1027-1033.

Kasai M, Hamaguchi Y, Zhu SE, Miyake T, Sakurai T, Machida T. 1992. High survival of rabbit morula after vitrification in an ethylene glycol-based solution by simple method [J]. *Biol. Reprod.*, **46** (6): 1042-1046.

Lawitts JA, Biggers JD. 1993. Culture of preimplantation embryos [J]. *Methods Enzymal.*, **225**: 153-164.

Massip A, Van der Zwalmen P, Scheffen B, Puissant F, Camus M, Leroy F. 1986. Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification [J]. *Cryo. Lett.*, **7** (5): 270-273.

Palasz AT, Mapletoft RJ. 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances [J]. *Biotechnol. Adv.*, **14** (2): 127-149.

Palasz AT, Tornesi MB, Archer J, Mapletoft RJ. 1995. Media alternatives for the collection, culture and freezing of mouse and cattle embryos [J]. *Theriogenology*, **44** (5): 705-714.

Palasz AT, Thundathil J, De La Fuente J, Mapletoft RJ. 2000. Effect of reduced concentrations of glycerol and various macromolecules on the cryopreservation of mouse and cattle embryos [J]. *Cryobiology*, **41** (1): 35-42.

Rall WF. 1992. Cryopreservation of oocytes and embryos: Methods and applications [J]. *Animal Reproduction Science*, **28** (1-4): 237-245.

Rall WF, Fahy GM. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 ℃ by vitrification [J]. *Nature*, **313** (6003): 573-575.

Shaw JM, Trounson AO. 1989. Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique [J]. *Cryobiology*, **26** (5): 413-421.

Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. 1997. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran [J]. *Cryobiology*, **35** (3): 219-229.

Sun HX, Hu YL. 2003. The application of vitrification in the technology of assistant reproduction [J]. *Journal of Clinical Medicine in Practice*, **7** (2): 188-190. [孙海翔, 胡娅莉. 2003. 玻璃化冷冻在辅助生殖技术中的应用. 实验临床医药杂志, **7** (2): 188-190.]

Vicente JS, Viudes-de-Castro MP, Garcia ML. 1999. *In vivo* survival rate of rabbit morulae after vitrification in a medium without serum protein [J]. *Reprod. Nutr. Dev.*, **39** (5-6): 657-662.

Watson PF. 1981. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 ℃ by egg-yolk lipoprotein [J]. *J. Reprod. Fertil.*, **62** (2): 483-492.

Webster HL. 1982. Colloid osmotic pressure: Theoretical aspects and background [J]. *Clin. Perinatol.*, **9** (3): 505-521.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 [J]. *Science*, **178** (59): 411-414.

Yaswiati E, Holtz W. 1990. Successful transfer of vitrified goat embryo [J]. *Theriogenology*, **34** (4): 629-632.

（上接196页）

大蹼铃蟾抗精子多肽是从大蹼铃蟾皮肤中分离得到的一种单链抗精子多肽，其在聚丙烯酰胺多肽凝胶电泳上的表观分子量还原和非还原条件下为8 kDa，等电点8.8。大蹼铃蟾抗精子多肽的N端具20个氨基酸残基序列。制备方法是将活体大蹼铃蟾用水清洗干净，置于带盖的玻璃容器中，滴加无水乙醚，密闭容器3～5分钟，可见大量的泡沫状物质从大蹼铃蟾皮肤分泌出来，收集分泌物，离心去除沉淀，冷冻干燥后，经离子交换，凝胶过滤纯化后得到。具有较强精子制动活性和丝氨酸蛋白酶抑制活性，可应用于制备避孕药物和制备治疗胰腺炎及其他炎症药物。该研究内容获得“大蹼铃蟾抗精子多肽及其制备方法和在制药中的应用”专利授权（ZL00130617.0）。

大蹼铃蟾皮肤肽是从大蹼铃蟾皮肤分泌物中分离得到的一种单链多肽，分子量2674.2，等电点9.8，多肽全序列一级结构。其制备方法是将活体大蹼铃蟾用水清洗干净，置于带盖的玻璃容器中，滴加无水乙醚，密闭容器3～5分钟，可见大量的泡沫状物质从大蹼铃蟾皮肤分泌出来，收集分泌物，离心去除沉淀、冷冻干燥后，经离子交换、凝胶过滤柱层析分离纯化。大蹼铃蟾皮肤肽可应用于制备治微生物感染疾病药物、肿瘤治疗药物。具有显著的抑制细菌和真菌生长、肿瘤细胞抑制活性高等优点。该研究内容获得“大蹼铃蟾皮肤肽及其制备方法和在制药中的应用”专利授权（ZL00122415.8）。